

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2003年7月17日(17.07.2003)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 03/058227 A1

(51) 国际分类号: G01N 27/447

(21) 国际申请号: PCT/CN02/00857

(22) 国际申请日: 2002年11月29日(29.11.2002)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
01139831.0 2001年11月30日(30.11.2001) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 北京博奥生物芯片有限责任公司(CAPITAL BIOCHIP COMPANY, LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华西路甲2号, Beijing 100084 (CN)。清华大学(TSINGHUA UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华大学, Beijing 100084 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 刘鹏(LIU, Peng) [CN/US]; 邢婉丽(XING, Wanli) [CN/CN]; 梁冬(LIANG, Dong) [CN/CN]; 程京(CHENG, Jing) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华大学, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市西城区宣武门西大街129号金隅大厦602室, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

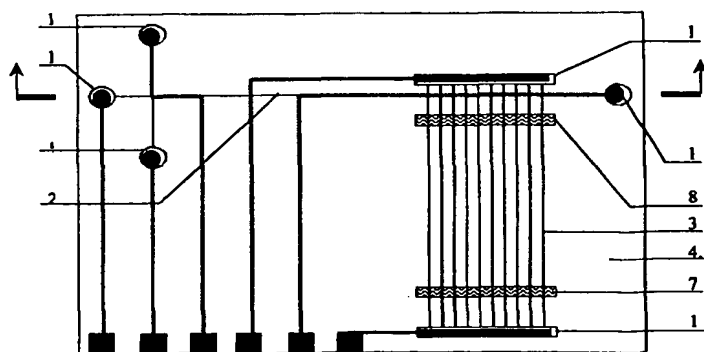
本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: CAPILLARY ELECTROPHORESIS CHIP APPARATUS FOR DETECTING POLYMORPHISM OF NUCLEOTIDE AND MONONUCLEOTIDE

(54) 发明名称: 检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置



(57) Abstract: A capillary electrophoresis chip apparatus for detecting polymorphism of nucleotide and mononucleotide belongs to capillary electrophoresis apparatuses. It is characterized in that this apparatus contains an upper channel layer having one or two or more dimension microfluid channel and a electrode aperture structure for sampling, a middle electrode layer for sealing said microfluid channel to form intact capillary and provide the needed voltage for electrophoresis, and a heating layer for providing a stable temperature gradient for electrophoresis. The three layers of upper and middle and lower are thermal conductive and stuck to each other.

[见续页]



(57) 摘要

检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置属于毛细管电泳装置。其特征在于它含有：具有一维或二维或多维微流体通道和加样用的电极孔结构的上层通道层，封闭上层微流体通道以构筑完整的毛细管且为电泳提供所需电压的中层电极层，以及为电泳提供稳定温度梯度的加热层，所述上、中、下三层是可导热且相互粘合的。

检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置

技术领域

一种检测单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, 简称 SNP) 用的毛细管电泳芯片装置, 属于毛细管电泳芯片装置技术领域。

5 背景技术

在基因组中普遍存在着单核苷酸多态性 (SNP), 据估计人类基因组中有300万个SNP位点。SNP在基因组中数量巨大、分布频密并且有二态性, 这些性质决定了它成为第三代遗传标记。寻找和研究SNP是人类基因组计划的重要内容 and 目标之一。作为多态性标记, SNP在人类学、医疗诊断、疾病研究、环境易感因子研究、药物筛选以及法医鉴定等方面具有重大意义。对脱氧核糖核酸 (DNA) 直接测序是检测SNP的最直接的方法, 但其工作量大, 效率低。目前人们致力于寻找高通量的方法。基于DNA解链动力学的检测方法就是一类高通量的方法, 它包括梯度变性胶电泳、恒变性胶电泳、毛细管变性胶电泳和变性高效液相层析。但是在这些方法中都需要加入变性剂, 而变性剂对电泳、色谱等的影响机制比较复杂, 变性剂的选择、电泳或色谱条件的设置以及梯度的实现等都是比较大的技术难题。

发明公开

本发明的目的是提供一种基于高速、高效、耗样量少的毛细管电泳之上的以温度来代替变性剂的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置。

本发明的特征在于, 它含有: 具有微流体通道和加样用的电极孔结构的上层通道层, 封闭上层微流体通道以构成起完整毛细管且为电泳芯片提供所需电压的中层电极层以及电泳提供稳定温度梯度的加热层, 其中, 上、中、下三层是可导热且相互粘合的。所述的微流体通道是一维、或二维、或多维微流体通道中的任何一种。所述的微流体通道的截面宽度或直径在 $5-200\ \mu\text{m}$ 之间, 流体通道深度在 $5-200\ \mu\text{m}$ 之间, 电泳分离通道的长度在 $1-30\text{cm}$ 之间。所述中层电极层的材料是金或铂或石墨中的任何一种。所述的中层电极层的上表面涂布着一层聚二甲基硅氧烷 (PDMS)。所

述的加热层带有相间隔地分成二组或多组且各自分别保持不同的恒定温度以便形成稳定的空间温度梯度的温控元件。所述加热层的稳定温度梯度是一种把芯片整体均匀逐渐升温而形成的时间温度梯度。

使用证明：它可以达到预期目的。

5 附图说明

图 1 为本发明提出的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置的原理示意图。

图 2 为本发明提出的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的优选实施例装置的上层通道层的俯视示意图。

10 图 3 为本发明提出的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的优选实施例装置的中间层电极层的俯视示意图。

图 4 为本发明提出的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的优选实施例装置的下层加热层的俯视示意图。

15 图 5 为本发明提出的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的优选实施例装置中图 1A-A 向的纵剖视图。

图 6 为图 2 中虚线框的俯视放大示意图。

图 7 为本发明优选实施例装置所用样品的预处理过程示意图。

实施发明的最佳方式

如图 1—图 6。图 1 是图 2、图 3 上、下层叠后的原理示意图。1 是电极孔，2 是第一维电泳分离通道。3 是第二维电泳分离通道，它共有 50 条，每条管宽 $100\mu\text{m}$ ，间距 $100\mu\text{m}$ ，深为 $10\mu\text{m}$ ，电泳分离通道的总长度为 30cm ，与电极孔 1 的连接管道宽 $20\mu\text{m}$ ，4 是上层流体通道层，即通道层。本优选实施例装置种，通道层 4 用聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 制成，也可以用其他硅橡胶、塑料、石英和玻璃中的任何一种，其电泳分离通道和加样用电极孔 1 的微加工方法有浇注、模压、蚀刻或光刻，随通道层材料而异。通道层 4 上的电泳分离通道即微流体通道的横截面呈矩形，也可以是任何其他几何形状。上述电泳分离通道是开放的毛细槽，用一片盖片把毛细槽封闭就形成完整的毛细管。同样，贯穿电泳分离通道的通道层也要

加盖片才形成完整的液池结构。5 是在中层电极层 6 上的电极。电极层 6 可以封闭上层电泳分离通道以形成完整毛细管又带有为电泳提供所需电压的电极。从图 1 中可知：电极 5 的裸露部分只在必要处与电极分离通道中的流体接触，提供所需电压，并能根据计算机控制按程序变换电压。电极层 6 可以通过在玻璃上沉积金属再蚀刻而成。金属层采用金，也可用铂或石墨中的任何一种，再金属层上利用氧化方法形成绝缘层，只在与通道层 4 上电极孔 1 对应位置把金属电极暴露出来，或者直接涂布 PDMS 层，只在电极孔 1 的位置裸露金属电极。当通道层 4 与电极层 6 粘合后，电极孔 1 中的溶液与电极层 6 形成的孔底暴露出底电极接触。这些暴露底电极为电泳提供电泳所需电压。电极 5 也可设计成针状，从通道层 4 上面插入电极孔 1 中与溶液接触，再沿着电泳分离通道对溶液起作用。加热层有加热和冷却两组温控元件。加热元件 7 保持较高底恒定温度，冷却元件 8 保持较低底恒定温度，两者间热量通过电极层 6 底材料玻璃传导，从而再玻璃中形成稳定底空间温度梯度。本实施例中加热和冷却元件用半导体温控元件，也可用电阻。图 6 是图 2 中虚线框底俯视放大示意图。9 是与电极孔 1 连接的通道，宽 $20\mu\text{m}$ ，10 是样品。2 是第一维电泳分离管道，3 是第二维电泳分离管道，箭头表示相应的电泳分离方向。在第一维电泳分离过程中可以防止样品 10 渗入第二维电泳分离管道 3，也可在第二维电泳分离过程中防止第二维电泳分离管道 3 和连接电极孔 1 的通道 9 对第一维电泳分离过程的干扰。它还可使第一维电泳分离得到的区带完整进入第二维电泳分离通道 3，而不致同时进入相邻的其他管道。图 5 是图 1 的 A-A 向纵剖视图，其构成已如上述。

图 7 为本发明优选实施例装置所使用样品的预处理过程原理示意图。11 是 PCR 聚合酶链式反应过程，12 是变性、复性过程。其中，B 代表 AGCT 中任一碱基，B*代表该位点为 SNP 点，“+”、“—”用以区分 DNA 的两条链。图 7 为存在 SNP 的情况，得到相同长度的 4 种 DNA 片段，有的存在错配。若不存在 SNP，则只能有一种 DNA 片段。现结合该图简要描述用本发明检测 SNP 的过程。对于可能存在 SNP 位点的待分析样品进行预处理，

使得 DNA 在存在 SNP 位点的地方发生错配，具体方法见图 7。第一维电泳使不同长度的 DNA 限制性内切片段得到有效分离。但是存在 SNP 位点的 DNA 和与其长度相同的 DNA 片段仍然存在于同一区带中。在第一维分离时，第二维管道两端加一定电压，防止样品扩散到第二维电泳分离通道 3 中。第二维电泳分离通道是一排阵列。第一维电泳分离出的各区带通过电压控制进入第二维阵列电泳通道 3 中继续进行电泳，在这个电泳过程中，加热层在电泳前进方向上提供了逐渐升高的温度梯度。有错配的 DNA 解链温度较无错配的低，在电泳前进不断升温的过程中首先解链，从而首先受到更大的阻滞力，与其他尚未解链的相同长度的 DNA 片段分离。只要系统分辨率足够高，就可以把尚未解链的相同长度的 DNA 片段分离。若只分离得到 1 条区带，就可以断定无 SNP 位点；若分离得到多于一条的区带，则可以断定存在 SNP。综合以上信息还可以指出 SNP 存在于哪一段 DNA 限制性片段上。

温度梯度也可以考虑在时间上实现温度梯度。在第二维电泳分离时，对电泳芯片均匀加热，控制好升温速率，可以达到与前述相同的目的。只要分离通道足够长，电泳分离效率足够高，也可用普通毛细管作一维电泳分离。分离出不同长度的 DNA 片段，然后采用时间温度梯度继续电泳。

由此可见，本申请既有毛细管电泳技术所特有的高速、高效、消耗样品少的优点，又可避免使用变性剂，使检测过程易于控制，其梯度也易于实现。

工业应用

本发明的毛细管电泳芯片装置可以广泛应用于检测核苷酸和单核苷酸多态性。

权利要求书

1、一种检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，含有电泳芯片，其特征，它含有：具有微流体通道和加样用的电极孔结构的上层通道层，封闭上层微流体通道以构成起完整毛细管且为电泳芯片提供所需电压的中层电极层以及电泳提供稳定温度梯度的加热层，其中，上、中、下三层是可导热且相互粘合的。

2、根据权利要求 1 所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述的微流体通道是一维、或二维、或多维微流体通道中的任何一种。

3、根据权利要求 1 所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述的微流体通道的截面宽度或直径在 5—200 μm 之间，流体通道深度在 5—200 μm 之间，电泳分离通道的长度在 1—30cm 之间。

4、根据权利要求 1 所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述中层电极层的材料是金或铂或石墨中的任何一种。

5、根据权利要求 1 所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述的中层电极层的上表面涂布着一层聚二甲基硅氧烷（PDMS）。

6、根据权利要求 1 所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述的加热层带有相间隔地分成二组或多组且各自分别保持不同的恒定温度以便形成稳定的空间温度梯度的温控元件。

7、根据权利要求 1 所述的检测核苷酸和单核苷酸多态性用的毛细管电泳芯片装置，其特征在于：所述加热层的稳定温度梯度是一种把芯片整体均匀逐渐升温而形成的时间温度梯度。

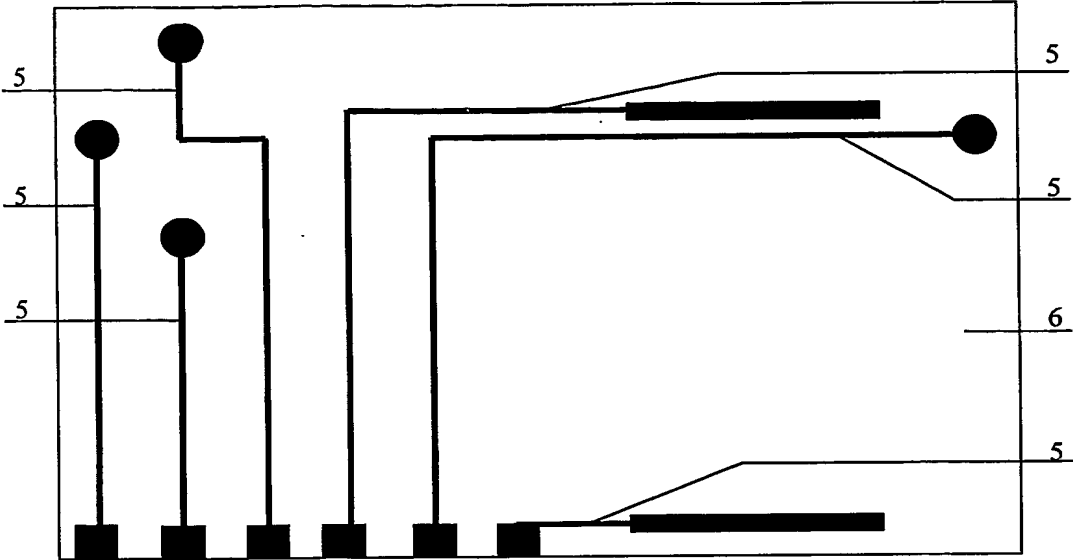


图 3

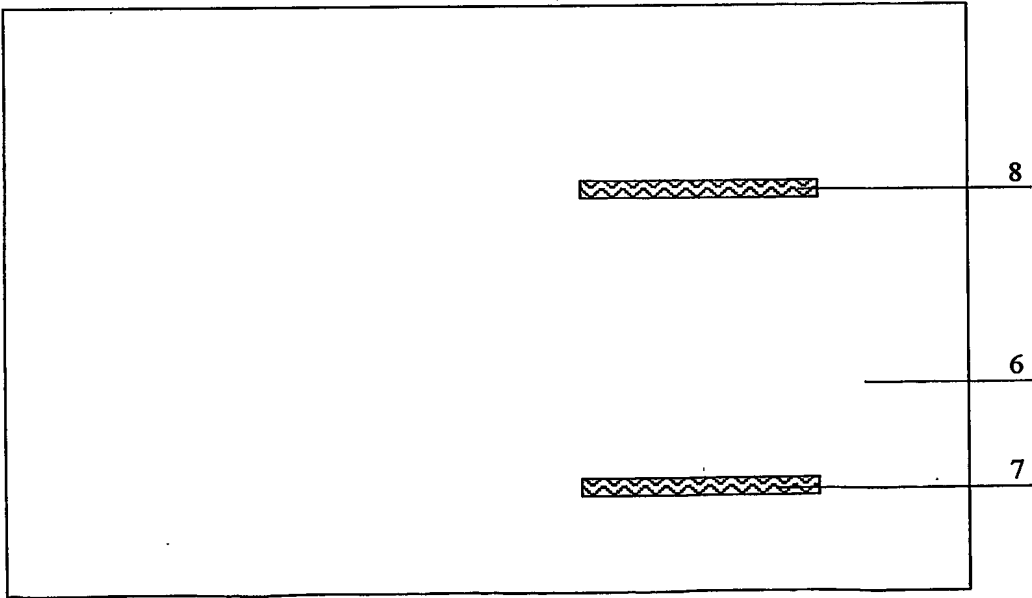


图 4

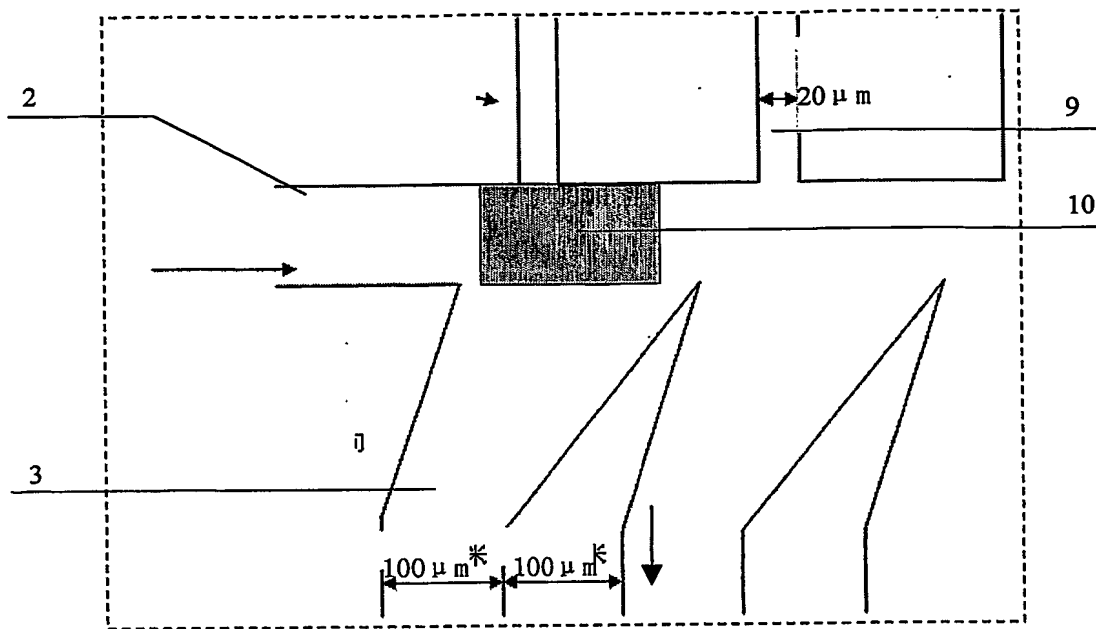


图 5

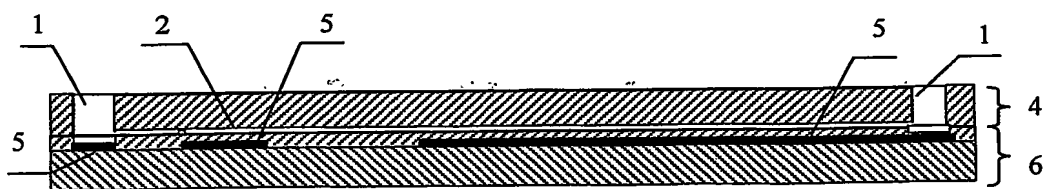


图 6

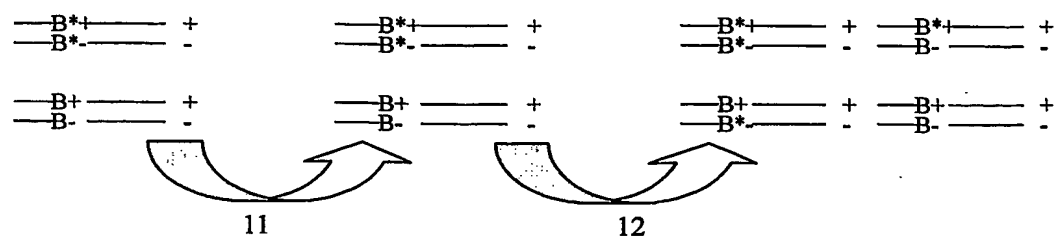


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN02/00857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ G01N, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese Patent Document (1985~)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPOCOD, PAJ, CNPAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN, A, 1235674(THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 17. November 1999(17.11.99), entire document	1-7
A	CN, A, 1168720(LOCKHEED MARTIN ENERGY RESEARCH CORPORATION) 24. December 1997(24.12.97), entire document	1-7
A	CN,A,1320818(QINGHUA UNIVERSITY), 07. November 2001(07.11.01), entire document	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15. May 2003(15.05.03)

Date of mailing of the international search report
15 MAY 2003 (15.05.03)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

Telephone No. 86-10-62093916



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN02/00857

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO ,A, 0058721(INSTITUT FUR MIKROTECHNIK MAINZ GMBH) 05.October 2000(05.10.00), entire document	1-7
A	WO, A, 0168898(MOLECULAR DYNAMICS, INC.) 20.September 2001(20.09.01), entire document	1-7
A	JP, A, 8233778(SHIMADZU CORPORATION), 13.September 199(13.09.96), entire document	1-7
A	JP, A, 2000227414(SHIMADZU CORPORATION), 15.Auguster 2000(15.08.00), entire document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/CN02/00857

Patent document cited in search report	Publication data	Patent family member(s)	Publication data
CN, A, 1235674	17.11.99	WO,A,9809161 US, A, 5906723 AU,A,4090597 EP,A,0922218 AU,B,714163 US,A,6045676	05.03.98 25.05.99 19.03.98 16.06.99 23.12.99 04.04.00
CN, A, 1168720	24.12.97	WO, A, 9604547 CA,A,2196429 AU,A,3150895 EP,A,0775306 JP,T,10507516 US,A,5858195 AU,B,701348 US,A,6001229 US,A,6010607 US,A,6010608 US,A,6033546 EP,A,1162455 US,A,2002008030	15.02.96 15.02.96 04.03.96 28.05.97 21.07.98 12.01.99 28.01.99 14.12.99 04.01.00 04.01.00 07.03.00 12.12.01 24.01.02
CN, A, 1320818	07.11.01	None	
WO, A, 0058721	05.10.00	AU,A,3963300 DE,A,10013513	16.10.00 19.10.00
WO, A, 0168898	20.09.01	US,A,2001025792	04.10.01
JP, A, 8233778	13.09.96	JP,B,2937064	23.08.99
JP, A, 2000227414	15.08.00	None	

A. 主题的分类

IPC⁷ G01N27/447

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ G01N, C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献(1985~)

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI, EPDOC, PAJ, CNPAT

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	CN, A, 1235674(加利福尼亚大学董事会) 17.11 月 1999(17.11.99), 全文	1-7
A	CN, A, 1168720(罗克贺德马丁能源系统有限公司) 24.12 月 1997(24.12.97), 全文	1-7
A	CN, A, 1320818(清华大学) 07.11 月 2001(07.11.01), 全文	1-7

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A”明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E”在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L”可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P”公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T”在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X”特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y”特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性

“&”同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

15.5 月 2003(15.05.03)

国际检索报告邮寄日期

15. 5月 2003 (15. 05. 03)

国际检索单位名称和邮寄地址

ISA/CN

中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员

电话号码: 86-10-62093916



C(续). 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	WO ,A, 0058721(INSTITUT FUR MIKROTECHNIK MAINZ GMBH) 05.10 月 2000(05.10.00), 全文	1 - 7
A	WO, A, 0168898(MOLECULAR DYNAMICS, INC.) 20.9 月 2001(20.09.01), 全文	1 - 7
A	JP, A, 8233778(株式会社岛津制作所) 13.9 月 1996(13.09.96), 全文	1 - 7
A	JP, A, 2000227414(株式会社岛津制作所) 15.8 月 2000(15.08.00), 全文	1-7

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN, A, 1235674	17.11.99	WO,A,9809161 US, A, 5906723 AU,A,4090597 EP,A,0922218 AU,B,714163 US,A,6045676	05.03.98 25.05.99 19.03.98 16.06.99 23.12.99 04.04.00
CN, A, 1168720	24.12.97	WO, A, 9604547 CA,A,2196429 AU,A,3150895 EP,A,0775306 JP,T,10507516 US,A,5858195 AU,B,701348 US,A,6001229 US,A,6010607 US,A,6010608 US,A,6033546 EP,A,1162455 US,A,2002008030	15.02.96 15.02.96 04.03.96 28.05.97 21.07.98 12.01.99 28.01.99 14.12.99 04.01.00 04.01.00 07.03.00 12.12.01 24.01.02
CN, A, 1320818	07.11.01	无	
WO, A, 0058721	05.10.00	AU,A,3963300 DE,A,10013513	16.10.00 19.10.00
WO, A, 0168898	20.09.01	US,A,2001025792	04.10.01
JP, A, 8233778	13.09.96	JP,B,2937064	23.08.99
JP, A, 2000227414	15.08.00	无	